

频发复发肾病综合征患儿外周血记忆B细胞亚群分布变化

袁文君 程巾 刘春梅 刘君吟 石梦月 陆书文 关凤军

(徐州医科大学附属医院儿科, 江苏徐州 221000)

[摘要] **目的** 观察记忆B细胞在频发复发肾病综合征(frequently relapsing nephrotic syndrome, FRNS)患儿病程中分布变化。**方法** 前瞻性选择2020年10月—2021年10月就诊于徐州医科大学附属医院儿科的原发肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)患儿35例,根据其糖皮质激素(glucocorticoid, GC)治疗后的反应及复发频次,分为FRNS组、非频发复发肾病综合征(non-frequently relapsing nephrotic syndrome, NFRNS)组;选择同期15例体检儿童为健康对照组。比较各组GC治疗前后记忆B细胞变化,并与临床指标作相关性分析。**结果** 治疗前,FRNS组、NFRNS组总B细胞、总记忆B细胞、IgD⁺记忆B细胞、IgE⁺记忆B细胞比例均较健康对照组增高,且FRNS组较NFRNS组增高明显($P<0.05$);FRNS组类别转换记忆B细胞比例较NFRNS组及健康对照组降低($P<0.05$);治疗后,FRNS组、NFRNS组总B细胞、总记忆B细胞、IgM⁺IgD⁺记忆B细胞、IgM⁺记忆B细胞、IgE⁺记忆B细胞、IgD⁺记忆B细胞、IgG⁺记忆B细胞比例较治疗前降低($P<0.05$);类别转换记忆B细胞比例较治疗前增高($P<0.05$)。FRNS组尿蛋白定量高于NFRNS组及健康对照组($P<0.05$),FRNS组白蛋白水平低于健康对照组($P<0.05$);FRNS组尿蛋白定量与类别转换记忆B细胞比例呈负相关,与IgE⁺记忆B细胞比例呈正相关($P<0.05$)。**结论** FRNS患儿存在记忆B细胞亚群的分布异常;而IgE⁺记忆B细胞和类别转换记忆B细胞比例可作为FRNS患儿在GC治疗后复发的正相关和负相关因素。 [中国当代儿科杂志, 2023, 25 (2): 172-178]

[关键词] 频发发;肾病综合征;记忆B细胞;儿童

Distribution of memory B cell subsets in peripheral blood of children with frequently relapsing nephrotic syndrome

YUAN Wen-Jun, CHENG Jin, LIU Chun-Mei, LIU Jun-Han, SHI Meng-Yue, LU Shu-Wen, GUAN Feng-Jun. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China (Guan F-J, Email: guanxiaomu@sina.com)

Abstract: Objective To investigate the change in the distribution of memory B cell subsets in children with frequently relapsing nephrotic syndrome (FRNS) during the course of the disease. **Methods** A total of 35 children with primary nephrotic syndrome (PNS) who attended the Department of Pediatrics of the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University from October 2020 to October 2021 were enrolled as subjects in this prospective study. According to the response to glucocorticoid (GC) therapy and frequency of recurrence, the children were divided into two groups: FRNS ($n=20$) and non-FRNS (NFRNS; $n=15$). Fifteen children who underwent physical examination were enrolled as the control group. The change in memory B cells after GC therapy was compared between groups, and its correlation with clinical indicators was analyzed. **Results** Before treatment, the FRNS and NFRNS groups had significantly increased percentages of total B cells, total memory B cells, IgD⁺ memory B cells, and IgE⁺ memory B cells compared with the control group, and the FRNS group had significantly greater increases than the NFRNS group ($P<0.05$); the FRNS group had a significantly lower percentage of class-switched memory B cells than the NFRNS and control groups ($P<0.05$). After treatment, the FRNS and NFRNS groups had significant reductions in the percentages of total B cells, total memory B cells, IgM⁺IgD⁺ memory B cells, IgM⁺ memory B cells, IgE⁺ memory B cells, IgD⁺ memory B cells, and IgG⁺ memory B cells ($P<0.05$) and a significant increase in the percentage of class-switched memory B cells ($P<0.05$).

[收稿日期] 2022-09-27; [接受日期] 2022-12-05

[基金项目] 国家自然科学基金(82173630)。

[作者简介] 袁文君,女,硕士研究生。

[通信作者] 关凤军,女,副教授。Email: guanxiaomu@sina.com。

The FRNS group had a significantly higher urinary protein quantification than the NFRNS and control groups ($P<0.05$) and a significantly lower level of albumin than the control group ($P<0.05$). In the FRNS group, urinary protein quantification was negatively correlated with the percentage of class-switched memory B cells and was positively correlated with the percentage of IgE⁺ memory B cells ($P<0.05$). **Conclusions** Abnormal distribution of memory B cell subsets may be observed in children with FRNS, and the percentages of IgE⁺ memory B cells and class-switched memory B cells can be used as positive and negative correlation factors for predicting recurrence after GC therapy in these children.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(2): 172-178]

Key words: Frequently relapsing; Nephrotic syndrome; Memory B cell; Child

原发性肾病综合征 (primary nephrotic syndrome, PNS) 是儿童常见的肾小球疾病之一, 微小病变型是其最常见的病理类型。初发微小病变型 PNS 患儿主要应用糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 治疗, 70%~90% 的患儿对 GC 敏感, 但其中约 50% 患儿表现为频复发肾病综合征 (frequently relapsing nephrotic syndrome, FRNS)^[1]。频繁复发会对 PNS 患儿长期预后产生不良影响, 但其发生机制仍不清楚。

B 细胞清除剂利妥昔单抗 (rituximab, RTX) 治疗可显著降低 FRNS 患者的复发率, 提示 B 细胞可能在 FRNS 患儿的疾病发生、发展中发挥了重要作用^[2]。但是, 我们在临床上观察到, 部分 FRNS 患儿经 RTX 治疗后, 即便外周血 B 细胞数目已经恢复正常, 仍能保持长久无复发; 而一些患儿即使外周血 B 细胞数量被清除至极低水平 ($<5\%$), 仍不能获得临床缓解。因此, 虽然临床上常通过监测总 B 细胞数目来确定进一步的治疗, 但其并不能作为真正反映 PNS 临床疾病活动的有效指标。

与 GC 治疗相似, 部分 FRNS 患儿在 RTX 治疗后, 疾病仍会复发, 其中伴随记忆 B 细胞在 RTX 介导的 B 细胞耗竭期发生迅速重建^[3-4]。前期我们课题组研究也发现, 总记忆 B 细胞数量在 FRNS 患儿活动期显著增高, 与疾病活动相关^[5]。以上证据提示, 记忆 B 细胞可能在 FRNS 患儿疾病活动中发挥了重要作用, 而监测记忆 B 细胞亚群可能有助于预测 PNS 的复发, 有助于指导再次用药时间。然而, 记忆 B 细胞和其不同亚群在 GC 治疗 PNS 患儿前后的变化, 以及其与 FRNS 患儿疾病复发的临床相关性尚未见报道。

因此, 在本研究中, 我们应用流式细胞检测技术, 分析了 FRNS 患儿在 GC 治疗前后外周血记忆 B 细胞亚群的分布变化, 进一步探索记忆 B 细胞在预测 PNS 患儿 GC 治疗后复发的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

前瞻性选择 2020 年 10 月—2021 年 10 月就诊于徐州医科大学附属医院儿科的初发 PNS 患儿 35 例, 根据 GC 治疗后的反应及复发频次, 分为 FRNS 组 (20 例)、非频复发肾病综合征 (non-frequently relapsing nephrotic syndrome, NFRNS) 组 (15 例); 另选择同期 15 例健康体检儿童为健康对照组。PNS 诊断符合中华医学会儿科学分会肾脏学组发布的《儿童激素敏感、复发/依赖肾病综合征诊治指南 (2016)》的标准^[6]。排除标准: (1) 有肾脏病家族史; (2) 患有自身免疫性疾病、内分泌疾病及恶性肿瘤等继发性因素; (3) 应用过免疫抑制剂; (4) GC 耐药者。FRNS 组男 15 例, 女 5 例, 平均年龄 (6.7 ± 2.5) 岁; NFRNS 组男 10 例, 女 5 例, 平均年龄 (7.2 ± 2.0) 岁; 健康对照组男 9 例, 女 6 例, 平均年龄 (6.9 ± 2.6) 岁; 三组患儿的性别 ($\chi^2=0.976$, $P=0.642$)、年龄 ($F=0.067$, $P=0.935$) 比较差异均无统计学意义。所有患儿家长均知情同意, 本研究已获徐州医科大学医学伦理委员会批准 (XYFY2022-KL136-01)。

1.2 治疗及疗效判定

PNS 患儿确诊后在诱导缓解阶段给予泼尼松 $2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 分 3 次口服; 待尿蛋白转阴后, 每晨顿服, 共 4 周; 巩固维持阶段泼尼松 $2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 隔日晨顿服, 维持 4 周, 逐渐减量, 总疗程 12 个月。完全缓解以实验室检查正常、临床症状消失为标准。在患儿达到完全缓解后 1 周复查各项指标。

PNS 复发的诊断标准: 连续 3 d, 晨尿蛋白由阴性转为 (++) ~ (+++), 或晨尿的尿蛋白/肌酐 (mg/mg) ≥ 2.0 , 或 24 h 尿蛋白定量 $\geq 50 \text{ mg}/\text{kg}$ 。NFRNS: 首次完全缓解后半年内复发 1 次, 或 1 年

内复发 ≤ 3 次。FRNS：经 GC 标准疗程治疗后缓解，但病程中半年内复发 ≥ 2 次，或 1 年内复发 ≥ 4 次^[7]。

1.3 流式细胞术检测记忆 B 细胞亚群

所有患儿入院第 2 天清晨采取静脉血 1 mL，取 1 根流式管，加入全血 300 μ L，磷酸盐缓冲液 2 mL，洗涤 2 次。依次向流式管内加入 BV510 标记的抗人 CD20 单克隆抗体（302340）、BV650 标记的抗人 CD19 单克隆抗体（563226）、PE 标记的抗人 CD27 单克隆抗体（302842）、APC 标记的抗人 IgM 抗体（314546）、Alexa Fluor 700 标记的抗人 IgD 抗体（561302）、Percp-cy7 抗人 IgE 抗体（325510）、BV421 标记的抗人 IgG 抗体（5625581）；室温避光孵育 15 min。每管加入磷酸盐缓冲液 2 mL，2 500 r/min，离心 2 min，洗涤 1 次。加入红细胞裂解液 2 mL，室温避光裂红 8 min，上机检测。上述单克隆抗体均购自上海优宁维生物科技股份有限公司，LSRFortessa™ 型流式细胞仪购自美国 BD Biosciences 公司，采用流式细胞分析软件 FlowJo v10.8.1 进行分析处理。

1.4 统计学分析

应用 IBM SPSS 26.0 统计软件进行数据处理。

正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组治疗前后比较采用配对 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 Bonferroni 法；不符合正态分布的计量资料用中位数（四分位数间距） $[P_{50} (P_{25}, P_{75})]$ 表示，多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验，组间两两比较采用 Bonferroni 法。计数资料采用例数和百分率 (%) 表示，组间比较采用卡方检验。采用 Pearson 相关分析评估两变量间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GC 治疗前各组记忆 B 细胞亚群表达情况比较

FRNS 组及 NFRNS 组总 B 细胞、总记忆 B 细胞、IgD⁺记忆 B 细胞、IgE⁺记忆 B 细胞比例均较健康对照组增高，且 FRNS 组较 NFRNS 组增高更为明显 ($P < 0.05$)。FRNS 组类别转换记忆 B 细胞较 NFRNS 组及健康对照组降低 ($P < 0.05$)。三组 IgM⁺IgD⁺记忆 B 细胞、IgM⁺记忆 B 细胞、IgG⁺记忆 B 细胞比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1、表 1。

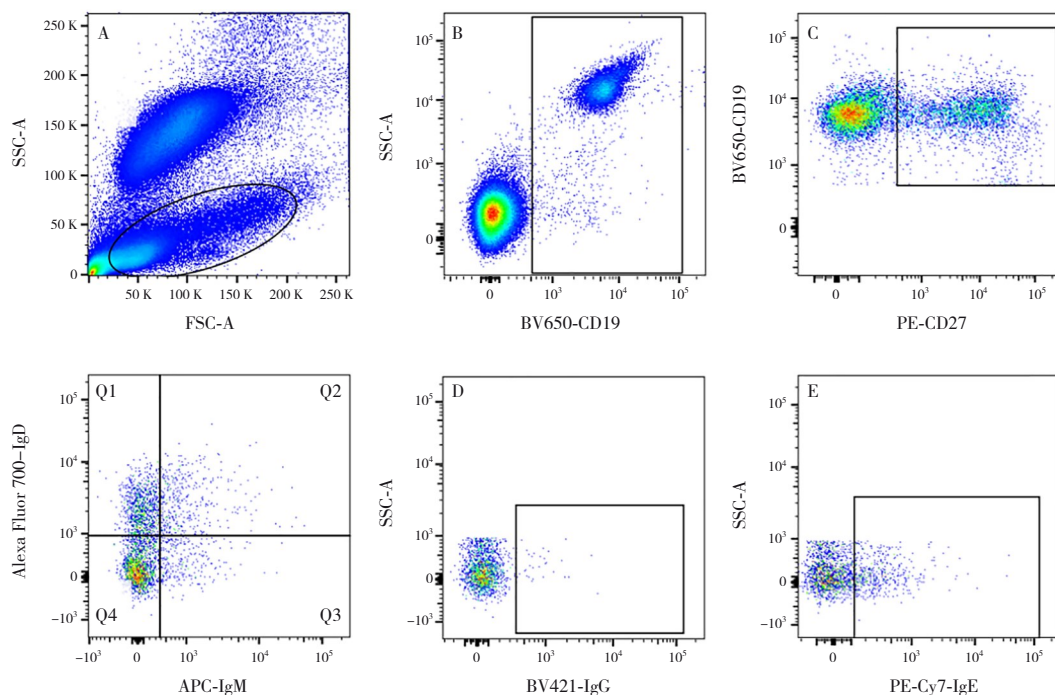


图 1 流式细胞术分析图 A 门为淋巴细胞，B 门为总 B 细胞 (CD19⁺)，C 门为总记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺)，Q1 为 IgD⁺记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgD⁺IgM⁻)，Q2 为 IgM⁺IgD⁺记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgM⁺IgD⁺)，Q3 为 IgM⁺记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgM⁺IgD⁻)，Q4 为类别转换记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgM⁻IgD⁻)，D 门为 IgG⁺记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgG⁺IgM⁻)，E 门为 IgE⁺记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺IgE⁺IgM⁻)。

表 1 FRNS 组、NFRNS 组 GC 治疗前与健康对照组记忆 B 细胞亚群水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

淋巴细胞亚群	健康对照组 (n=15)	NFRNS 组 (n=15)	FRNS 组 (n=20)	F 值	P 值
总 B 细胞 (CD19 ⁺)	4.97 ± 2.50	9.40 ± 3.04 ^a	12.64 ± 4.02 ^{a,b}	22.560	<0.001
总记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺)	28.14 ± 4.41	34.40 ± 5.80 ^a	42.87 ± 8.09 ^{a,b}	22.555	<0.001
IgD ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ IgM ⁻)	12.59 ± 4.96	17.29 ± 7.19 ^a	23.47 ± 10.20 ^{a,b}	8.009	0.001
IgM ⁺ IgD ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺)	11.01 ± 5.00	10.72 ± 5.06	10.64 ± 3.77	0.031	0.970
类别转换记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	68.44 ± 6.84	63.45 ± 8.39	55.78 ± 10.09 ^{a,b}	9.390	0.011
IgM ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻)	7.95 ± 3.29	8.54 ± 4.87	7.82 ± 4.35	0.130	0.878
IgE ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgE ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	7.09 ± 2.59	12.71 ± 7.74 ^a	18.88 ± 8.08 ^{a,b}	20.184	<0.001
IgG ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgG ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	0.66 ± 0.48	1.08 ± 0.69	1.02 ± 0.56	2.323	0.109

注：a 示与健康对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与 NFRNS 组比较， $P<0.05$ 。[NFRNS] 非复发肾病综合征；[FRNS] 复发肾病综合征。

2.2 GC 治疗后各组记忆 B 细胞亚群表达情况比较

FRNS 组及 NFRNS 组总 B 细胞、总记忆 B 细胞、IgE⁺记忆 B 细胞、IgD⁺记忆 B 细胞、IgG⁺记忆 B 细胞比例较治疗前降低 ($P<0.05$)，与健康对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。IgM⁺IgD⁺记忆 B

细胞、IgM⁺记忆 B 细胞较治疗前降低，且低于健康对照组 ($P<0.05$)。类别转换记忆 B 细胞较治疗前增高，且高于健康对照组 ($P<0.05$)。FRNS 组与 NFRNS 组各 B 细胞亚群比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2~3。

表 2 FRNS 组、NFRNS 组 GC 治疗后与健康对照组记忆 B 细胞亚群水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

淋巴细胞亚群	健康对照组 (n=15)	NFRNS 组 (n=15)	FRNS 组 (n=20)	F 值	P 值
总 B 细胞 (CD19 ⁺)	4.97 ± 2.50	4.83 ± 1.45	4.87 ± 1.94	0.021	0.980
总记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺)	28.14 ± 4.41	30.04 ± 3.31	31.49 ± 5.67	2.182	0.124
IgD ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁺)	12.59 ± 4.96	11.15 ± 2.77	13.53 ± 3.98	1.514	0.231
IgM ⁺ IgD ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺)	11.01 ± 5.00	1.77 ± 0.64 ^a	1.82 ± 1.03 ^a	55.721	<0.001
类别转换记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	68.44 ± 6.84	84.80 ± 2.82 ^a	82.45 ± 4.29 ^a	50.916	<0.001
IgM ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻)	7.95 ± 3.29	2.07 ± 0.79 ^a	2.20 ± 0.80 ^a	22.320	<0.001
IgE ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgE ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	7.09 ± 2.59	8.62 ± 3.21	9.03 ± 1.88	2.623	0.083
IgG ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgG ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	0.66 ± 0.48	0.37 ± 0.26	0.33 ± 0.18	3.080	0.064

注：a 示与健康对照组比较， $P<0.05$ 。[NFRNS] 非复发肾病综合征；[FRNS] 复发肾病综合征。

表 3 FRNS 组、NFRNS 组 GC 治疗前后记忆 B 细胞亚群水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

淋巴细胞亚群	FRNS 组 (n=20)				NFRNS 组 (n=15)			
	治疗前	治疗后	t 值	P 值	治疗前	治疗后	t 值	P 值
总 B 细胞 (CD19 ⁺)	12.64 ± 4.02	4.87 ± 1.94	12.184	<0.001	9.40 ± 3.04	4.83 ± 1.45	7.321	<0.001
总记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺)	42.87 ± 8.09	31.49 ± 5.67	6.848	<0.001	34.40 ± 5.80	30.04 ± 3.31	4.795	<0.001
IgD ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁺)	23.47 ± 10.20	13.53 ± 3.98	5.998	<0.001	17.29 ± 7.19	11.15 ± 2.77	5.041	<0.001
IgM ⁺ IgD ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺)	10.64 ± 3.77	1.82 ± 1.03	12.986	<0.001	10.72 ± 5.06	1.77 ± 0.64	7.395	<0.001
类别转换记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	55.78 ± 10.09	82.45 ± 4.29	-14.903	<0.001	63.45 ± 8.39	84.80 ± 2.82	-12.747	<0.001
IgM ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻)	7.82 ± 4.35	2.20 ± 0.80	6.631	<0.001	8.54 ± 4.87	2.07 ± 0.79	5.936	<0.001
IgE ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgE ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	18.88 ± 8.08	9.03 ± 1.88	6.863	<0.001	12.71 ± 7.74	8.62 ± 3.21	3.013	0.009
IgG ⁺ 记忆 B 细胞 (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgG ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻)	1.02 ± 0.56	0.33 ± 0.18	7.124	<0.001	1.08 ± 0.69	0.37 ± 0.26	5.492	<0.001

注：[NFRNS] 非复发肾病综合征；[FRNS] 复发肾病综合征。

2.3 三组患儿治疗前临床指标的比较及相关性分析

FRNS 组尿蛋白定量高于 NFRNS 组及健康对照组 ($P<0.05$)。FRNS 组白蛋白水平低于健康对照组 ($P<0.05$)，与 NFRNS 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。三组肌酐及尿素水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 4。

类别转换记忆 B 细胞比例与尿蛋白定量呈负相关 ($r=-0.512$, $P=0.021$)，IgE⁺记忆 B 细胞比例与尿蛋白定量呈正相关 ($r=0.571$, $P=0.009$)，见图 2。总 B 细胞、总记忆 B 细胞、IgD⁺记忆 B 细胞、IgM⁺IgD⁺记忆 B 细胞、IgM⁺记忆 B 细胞、IgG⁺记忆 B 细胞比例与尿蛋白定量无相关性 (分别 $r=0.209$ 、 0.172 、 0.126 、 0.101 、 0.250 、 0.244 , $P>0.05$)。

表 4 三组患儿 GC 治疗前临床指标水平比较

指标	健康对照组 (n=15)	NFRNS 组 (n=15)	FRNS 组 (n=20)	F/H 值	P 值
白蛋白 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$, g/L]	40.20(36.70, 44.40)	26.60(19.70, 28.60) ^a	20.40(18.42, 23.17) ^a	32.933	0.001
肌酐 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$, $\mu\text{mol/L}$]	33.00(29.00, 38.00)	30.00(27.00, 36.00)	32.00(28.50, 37.75)	0.724	0.696
尿蛋白定量 ($\bar{x} \pm s$, g/d)	0.06 $\pm$ 0.03	4.60 $\pm$ 2.70 ^a	7.63 $\pm$ 3.88 ^{a,b}	27.951	0.001
尿素 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	3.96 $\pm$ 1.02	3.92 $\pm$ 1.08	4.87 $\pm$ 1.42	2.796	0.071

注：a 示与健康对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与 NFRNS 组比较， $P<0.05$ 。[NFRNS] 非复发肾病综合征；[FRNS] 复发肾病综合征。

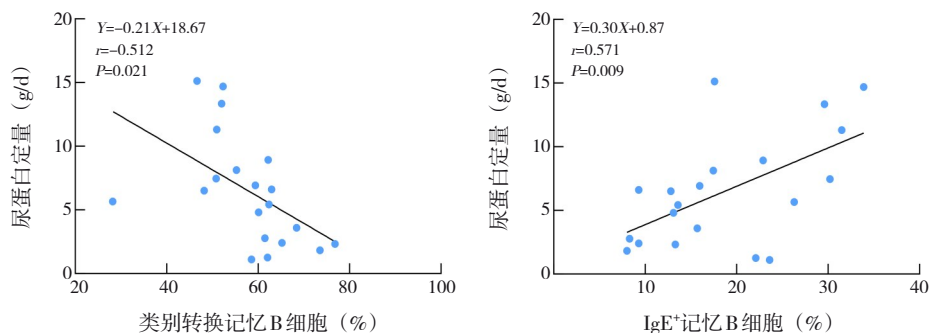


图 2 类别转换记忆 B 细胞、IgE⁺记忆 B 细胞与尿蛋白定量的相关性分析

3 讨论

随着 B 细胞耗竭疗法在 PNS 中的成功应用，B 细胞在其发病机制中的作用逐渐被认识。而记忆 B 细胞在 B 细胞耗竭期的重建，与 PNS 复发显著相关。记忆 B 细胞与初始 B 细胞相比，更易活化，一旦再次遭遇同一特异性抗原，迅速活化、增殖，产生高亲和力特异性抗体^[8]。记忆 B 细胞常通过肿瘤坏死因子超家族成员 CD27 的表达来鉴定，主要包括 3 种类别转换前记忆 B 细胞 (IgM⁺IgD⁺、IgM⁺IgD⁻ 和 IgD⁺IgM⁻) 和类别转换的 IgM⁻IgD⁻ 表型 (IgG、IgA 或 IgE)^[9]。已证实在不同疾病中，记忆 B 细胞的比例与疾病活动程度和治疗反应相关。研究发现，IgA 肾病患者外周血类别转换前记忆 B 细胞显著增高，且与尿蛋白水平呈正相关^[10]；系统性红斑狼疮患儿外周血中类别转换记忆 B 细胞比例的增加，与患儿对免疫抑制剂的治疗不敏感有关^[11]。在心脏移植、造血干细胞移植及血液透析

患者中，类别转换记忆 B 细胞比例减少显著增加感染概率^[12-14]。类别转换前记忆 B 细胞以 T 细胞非依赖抗原的方式，分泌 IgM 抗体，而类别转换记忆 B 细胞以 T 细胞依赖方式，在 T 细胞的辅助下分泌高亲和力 IgG 抗体^[15]。

本研究显示，FRNS 组患儿初次发病总 B 细胞、记忆 B 细胞比例显著高于 NFRNS 组及健康对照组，提示 FRNS 患儿体内存在 B 细胞、记忆 B 细胞的异常活化，与 Colucci 等^[16]、Ling 等^[17] 研究一致；我们进一步分析了记忆 B 细胞功能亚型，发现 FRNS 组患儿在初发时，类别转换前 IgD⁺记忆 B 细胞比例增加，类别转换记忆 B 细胞比例降低，这与刘光磊等^[18] 研究结果一致。而研究发现，PNS 患儿在初发期记忆 B 细胞增高，以类别转换记忆 B 细胞增高为主，应用 RTX 后，类别转换记忆 B 细胞的恢复可以预测疾病复发^[3-4]。分析有以下两个原因：一方面该研究是在患儿应用 RTX 后，检测其外周血淋巴细胞亚群情况，而免疫抑制剂的应用可能会

影响其原有记忆B细胞分布情况；另一方面我们将类别转换前IgM⁺记忆B亚型细分为IgM⁺IgD⁺、IgM⁺IgD⁻和IgD⁺IgM⁻3个亚型，而先前的研究并未细分此亚群。Geisberger等^[19]研究显示，IgD⁺记忆B细胞在遇到抗原刺激时能够通过调节B细胞信号强度，提高阴性选择的阈值。综上，推测患儿类别转换记忆B细胞的减少，可能与IgD⁺记忆B细胞提高了记忆B细胞的阴性选择，使其向IgM⁻IgD⁻转换降低有关。类别转换记忆B细胞能够提高机体对异种抗原的清除能力，降低机体感染风险。而感染是PNS患儿复发的常见原因之一，因此我们推测FRNS患儿频发可能与其外周血类别转换记忆B细胞减少，潜在感染风险增加有关。

在类别转换记忆B细胞的基础上，我们进一步将类别转换记忆B细胞分为IgE⁺和IgG⁺记忆B细胞亚群，发现FRNS组患儿初发时，IgE⁺记忆B细胞比例显著高于NFRNS组及健康对照组，且IgE⁺记忆B细胞与尿蛋白定量呈正相关。临床研究也发现，50%~70%的PNS患儿外周血总IgE升高，并出现多种特应性疾病的表型，而接触过敏原也常常与复发相关^[20]。过敏性疾病与PNS之间存在共同的发病机制^[21]。在调节IgE合成、促进B细胞增殖分化中，表达于活化的B淋巴细胞的跨膜糖蛋白CD23发挥了重要作用，它易被蛋白水解酶裂解为可溶性CD23^[22]。我们前期研究发现FRNS患儿在疾病活动期可溶性CD23显著升高^[23]，因此，我们推测患儿IgE⁺记忆B细胞的增高，可能与患儿体内存在B细胞的异常活化及可溶性CD23异常高表达有关。

为进一步了解缓解期两组患儿记忆B细胞亚群是否存在差异，我们分析了GC治疗后两组记忆B细胞的分布情况。两组IgM⁺IgD⁺记忆B细胞、IgM⁺记忆B细胞较治疗前降低，均低于健康对照组；类别转换记忆B细胞高于健康对照组。提示即使是在缓解期，PNS患儿的部分记忆B细胞亚群也未能恢复至正常水平，这与PNS疾病活动可能密切相关。

综上所述，FRNS患儿存在记忆B细胞亚群的分布异常；IgE⁺记忆B细胞和类别转换记忆B细胞比例可作为FRNS患儿在GC干预后复发的正相关和负相关因素。

利益冲突声明：所有作者声明不存在利益冲突关系。

[参考文献]

- [1] Williams AE, Gbadegesin RA. Steroid regimen for children with nephrotic syndrome relapse[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2021, 16(2): 179-181. PMID: 33478977. PMCID: PMC7863643. DOI: 10.2215/CJN.19201220.
- [2] Iijima K, Sako M, Oba M, et al. Mycophenolate mofetil after rituximab for childhood-onset complicated frequently-relapsing or steroid-dependent nephrotic syndrome[J]. J Am Soc Nephrol, 2022, 33(2): 401-419. PMID: 34880074. PMCID: PMC8819987. DOI: 10.1681/ASN.2021050643.
- [3] Fribourg M, Cioni M, Ghiggeri G, et al. CyTOF-enabled analysis identifies class-switched B cells as the main lymphocyte subset associated with disease relapse in children with idiopathic nephrotic syndrome[J]. Front Immunol, 2021, 12: 726428. PMID: 34621271. PMCID: PMC8490633. DOI: 10.3389/fimmu.2021.726428.
- [4] Colucci M, Carsetti R, Cascioli S, et al. B cell reconstitution after rituximab treatment in idiopathic nephrotic syndrome[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(6): 1811-1822. PMID: 26567244. PMCID: PMC4884116. DOI: 10.1681/ASN.2015050523.
- [5] 于跑, 彭倩倩, 董晨, 等. B淋巴细胞表型在激素依赖及频繁复发肾病综合征患儿的临床意义[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(7): 954-958. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2020.07.024.
- [6] 中华医学会儿科学分会肾脏学组. 儿童激素敏感、复发/依赖肾病综合征诊治循证指南(2016)[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(10): 729-734. PMID: 29050108. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2017.10.003.
- [7] Vivarelli M, Massella L, Ruggiero B, et al. Minimal change disease[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2017, 12(2): 332-345. PMID: 27940460. PMCID: PMC5293332. DOI: 10.2215/CJN.05000516.
- [8] Cancro MP, Tomayko MM. Memory B cells and plasma cells: the differentiative continuum of humoral immunity[J]. Immunol Rev, 2021, 303(1): 72-82. PMID: 34396546. DOI: 10.1111/imr.13016.
- [9] DiSano KD, Gilli F, Pachner AR. Memory B cells in multiple sclerosis: emerging players in disease pathogenesis[J]. Front Immunol, 2021, 12: 676686. PMID: 34168647. PMCID: PMC8217754. DOI: 10.3389/fimmu.2021.676686.
- [10] Si R, Zhao P, Yu Z, et al. Increased non-switched memory B cells are associated with plasmablasts, serum IL-6 levels and renal functional impairments in IgAN patients[J]. Immunol Invest, 2020, 49(1-2): 178-190. PMID: 31670996. DOI: 10.1080/08820139.2019.1683026.
- [11] Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol, 2000, 165(10): 5970-5979. PMID: 11067960. DOI: 10.4049/jimmunol.165.10.5970.
- [12] Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, et al. Alterations of naïve and memory B-cell subsets are associated with risk of rejection and infection in heart recipients[J]. Transpl Int, 2013, 26(8): 800-812. PMID: 23746145. DOI: 10.1111/tri.12131.

- [13] Guo M, Chen R, Xiang F, et al. Decreased percentage of memory B cells is independently associated with increased susceptibility to infection in patients on maintenance hemodialysis[J]. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50(11): 2081-2090. PMID: 30276601. DOI: 10.1007/s11255-018-1977-8.
- [14] Hilgendorf I, Mueller-Hilke B, Kundt G, et al. The lack of memory B cells including T cell independent IgM⁺ IgD⁺ memory B cells in chronic graft-versus host disease is associated with susceptibility to infection[J]. *Transpl Int*, 2012, 25(1): 87-96. PMID: 22098606. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2011.01388.x.
- [15] Shi Y, Agematsu K, Ochs HD, et al. Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD⁺ CD27⁺ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM[J]. *Clin Immunol*, 2003, 108(2): 128-137. PMID: 12921759. DOI: 10.1016/s1521-6616(03)00092-5.
- [16] Colucci M, Carsetti R, Cascioli S, et al. B cell phenotype in pediatric idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2019, 34(1): 177-181. PMID: 30267238. DOI: 10.1007/s00467-018-4095-z.
- [17] Ling C, Wang X, Chen Z, et al. Altered B-lymphocyte homeostasis in idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Front Pediatr*, 2019, 7: 377. PMID: 31649905. PMCID: PMC6794445. DOI: 10.3389/fped.2019.00377.
- [18] 刘光磊, 杨军, 李成荣. 儿童特发性肾病综合征低 IgG 血症机制: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白过表达对滤泡辅助性 T 细胞数量的可能影响[J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2020, 16(2): 171-180. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2020.02.008.
- [19] Geisberger R, Lamers M, Achatz G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD[J]. *Immunology*, 2006, 118(4): 429-437. PMID: 16895553. PMCID: PMC1782314. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2006.02386.x.
- [20] Zheng Y, Hou L, Wang XL, et al. A review of nephrotic syndrome and atopic diseases in children[J]. *Transl Androl Urol*, 2021, 10(1): 475-482. PMID: 33532335. PMCID: PMC7844495. DOI: 10.21037/tau-20-665.
- [21] Horinouchi T, Nozu K, Iijima K. An updated view of the pathogenesis of steroid-sensitive nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2022, 37(9): 1957-1965. PMID: 35006356. PMCID: PMC9307535. DOI: 10.1007/s00467-021-05401-4.
- [22] Engeroff P, Vogel M. The role of CD23 in the regulation of allergic responses[J]. *Allergy*, 2021, 76(7): 1981-1989. PMID: 33378583. PMCID: PMC8359454. DOI: 10.1111/all.14724.
- [23] 张远, 关凤军, 于跑, 等. 外周血 B 淋巴细胞 Notch 在频繁复发/激素依赖肾病综合征患儿的作用研究[J]. *医学研究杂志*, 2021, 50(6): 150-154. DOI: 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.06.034.

(本文编辑: 王颖)